

合成代謝工学的手法によるピルビン酸酸化経路の人工的構築

今川 貴志・本田 孝祐・岡野 憲司・大竹 久夫

大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻 生物化学工学領域

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1

E-mail: takashi_imagawa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Home Page: <http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/bc/>

微生物やこれらに由来する酵素を触媒として用いた化学品生産プロセスであるバイオプロセスは、常温常圧に近い比較的温和な条件下で、選択的に化学反応を進行させることができるため、省エネで環境負荷の小さい持続可能なプロセスとして注目を集めている。その一方で、有機化学的合成では必要とされない煩雑な操作と制御が足かせとなって、その普及は十分に進んでいるとは言いがたい。我々のグループではバイオプロセスの利便性を向上させるべく、「合成代謝工学」と名付けた新たな生体触媒利用技術を提案するとともに、本法を用いたオンデマンドでの化学品生産に挑戦している。本研究では、ピルビン酸と CoA から、様々な生体分子の前駆体となるアセチル CoA を生産可能なピルビン酸酸化経路に着目し、合成代謝工学的な手法を用いた本経路の人工的再構築に取り組んだ。

1. はじめに ～合成代謝工学とは～

生体触媒反応を利用した化学品生産プロセスであるバイオプロセスは、一般的に以下のような特長を有している。

- ① 常温常圧に近い温和な条件下でも反応が進行
- ② 生物の持つ代謝経路を活用し、ワンポットでの多段階反応が可能
- ③ 反応特異性が高く基質に対し高生産物収率が可能
- ④ 部位・立体特異的の反応の触媒が可能であり化学触媒では得ることが困難な有機化合物の生産が可能

以上のことから、バイオプロセスは、生産コストの削減や環境負荷の低減などにつながる持続可能な化学品生産プロセスであると言えるが^[1]、その利用分野は、食品産業や一部の医薬品中間体生産など限定的であるのが現状である。バイオプロセスにおける生体触媒の利用形態は、精製酵素を使用する場合と微生物菌体そのものを用いる場合の二つに大別できる。前者では酵素の精製に多大な手間がかかり、後者では副産物の生産を抑制するために複雑な培養制御が必要となるなどの問題を有しており、これらが産業利用のための大きな障壁となっている。一方、我々のグループでは、酵素を精製せず、簡便な反応制御のみで、目的生産物を選択的に生産することができる新たな生体触媒利用技術の開発に取り組み、本法を「合成代謝工学」と名付け、実践的バイオプロセスへの適応を目指している^[2]。

「合成代謝工学」では、好熱性微生物などに由来する耐熱性酵素遺伝子が大腸菌などの中温性微生物で発現させ、菌体を 70℃程度で熱処理に供した後、死滅菌体そのものを耐熱性酵素モジュールとして使用する(図 1)。形質転換後の遺伝子組換え中温性微生物を高温条件にさらすことにより、宿主由来酵素のほとんどは変性して失活するため、副反応が抑制でき、さらに細胞膜の脆弱化に伴う基質・生産物・補酵素などの細胞膜透過性の向上、死滅菌体であるため通気や攪拌などの

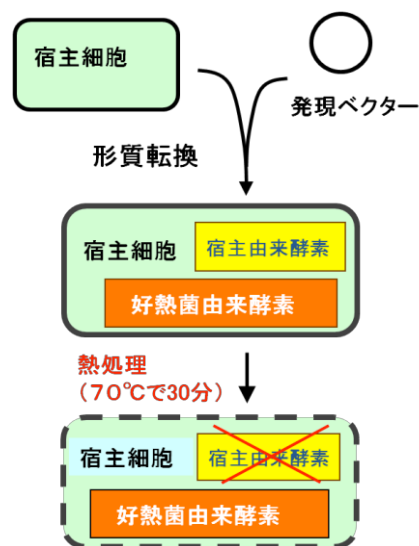


図 1. 耐熱性酵素モジュールの調製法

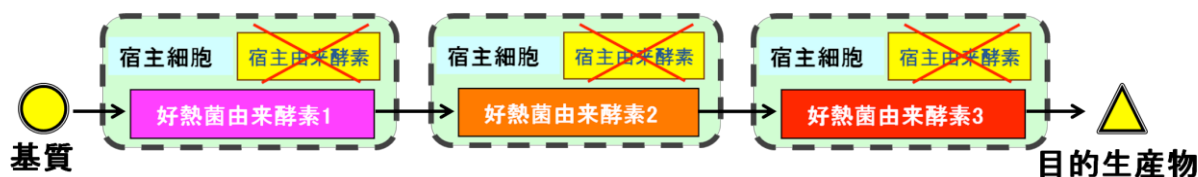


図 2. 耐熱性酵素モジュールの組み合わせによる目的物質生産に最適な代謝経路のデザイン

複雑な培養制御を必要としないという利点も得られる。また、任意の耐熱性酵素を用いることが可能であるため、本手法により調製した複数の耐熱性酵素モジュールを自由に組み合わせることにより目的物質生産に最適な代謝経路を自在にデザインすることができる(図 2)。

2. 人工ピルビン酸酸化経路の設計と構築

すでに我々のグループでは、合成代謝工学的手法によるキメラ型解糖系の構築と、これを用いたグルコースから乳酸の高収率生産に成功している^[3]。合成代謝工学の汎用性を高めるには、本法により生産可能な物質のラインアップを充実させることが重要となる。そこで本研究では、解糖系の最終生産物であるピルビン酸を生体内において様々な物質の前駆体となるアセチル CoA に変換するピルビン酸酸化反応に着目し、合成代謝工学による本経路の人工的再構築に取り組んだ。生体内においてピルビン酸からアセチル CoA への変換は pyruvate dehydrogenase (PDH) 複合体により触媒されるが、PDH 複合体は既知の複合タンパク質の中でも最大の多酵素複合体であり^[4]、これを異種宿主内で機能的に発現させることは困難と予測された。そこで我々は、pyruvate decarboxylase (PDC)によりピルビン酸をアセトアルデヒドへと変換し、生じたアセトアルデヒドを acetaldehyde dehydrogenase (AIDH)による酸化的 CoA 付加によりアセチル CoA へと変換する人工経路を設計した(図 3)。データベース検索の結果、複数の好熱菌にて AIDH の存在が確認され、このうち *Thermus thermophilus* HB8 由来の同酵素(*Tt*AIDH)が所望の活性を有することが確認された^[5]。PDC については好熱菌由来酵素の報告は見受けられなかったものの、中温性酢酸菌である

Acetobacter pasteurianus 由来の PDC (*Ap*PDC)の 60℃における半減期が 2 時間程度と比較的優れた耐熱性を示すとの報告に従い^[6]、*Tt*AIDH、*Ap*PDC のそれぞれを発現させた大腸菌混合液を用いて合成経路を構築した。*Ap*PDC の熱安定性を考慮し、各酵素の最適反応温度よりも若干低い 50℃での反応を実施した結果、現在までに 2.0 mM のピルビン酸から 1.2 mM のアセチル CoA を得ることに成功している。

3. 補酵素再生反応の導入と今後の展望

*Tt*AIDH は補酵素として NAD^+ を必要とする。このためピルビン酸からアセチル CoA への変換反応を継続的に行うには補酵素再生系の導入が必要と考えられた。そこで構築したピルビン酸酸化経路に NAD^+ 再生用反応として *T. thermophilus* HB8 由来の glutamate dehydrogenase (*Tt*GDH)による α -ケトグルタル酸からグルタミン酸への NADH 依存的還元反応をカップリングさせた。この結果、0.1 mM の NAD^+ を含む反応液中で、これを上回る濃度のアセチル CoA を得ることができ、*Tt*GDH による NAD^+ 再生系の有効性を示すことができた。

現在、我々は本経路を含めたより長大な人工代謝経路を構築し、*N*-アセチルグルタミン酸やブタノールなど様々な有用物質の高収率生産を目指して研究を進めている。

参考文献

- [1] 本田孝祐ら：ケミカルエンジニアリング，56，279-285 (2011)
- [2] 本田孝祐ら：バイオサイエンスとインダストリー，69，303-304 (2011)
- [3] Ye X., *et al.*: Microbial Cell Fact., 11:120, (2012)
- [4] Nakai T., *et al.*: J. Biochem., 143, 747-758 (2008)
- [5] Baker P., *et al.*: Biochemistry, 51, 1942-1952 (2012)
- [6] Gocke D., *et al.*: J. Mol. Catal. B: Enzym., 61, 30-35 (2009)

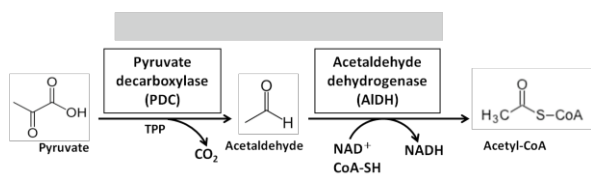


図 3. 人工ピルビン酸酸化経路